

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

03.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2003年 2月14日

出 願 番 号

Application Number:

特願2003-036472

[ST.10/C]:

[JP2003-036472]

出 願 人

Applicant(s):

株式会社島津製作所

REC'D 05 JUN 2003

WIPO

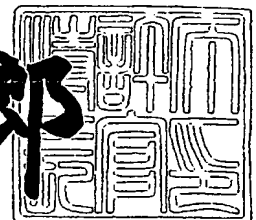
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月13日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3035990

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020713

【提出日】 平成15年 2月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/68

【発明者】

 【住所又は居所】 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所
 内

 【氏名】 九山 浩樹

【発明者】

 【住所又は居所】 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所
 内

 【氏名】 戸田 千香子

【発明者】

 【住所又は居所】 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所
 内

 【氏名】 西村 紀

【特許出願人】

 【識別番号】 000001993

 【氏名又は名称】 株式会社 島津製作所

 【電話番号】 075-823-1111

【代理人】

 【識別番号】 100100561

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岡田 正広

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 064002

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ペプチドのリン酸基を脱離する方法及びペプチドの解析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フッ化水素酸を用いてペプチドのリン酸基を脱離する方法。

【請求項 2】 前記フッ化水素酸を、10～100重量%の水溶液で用いる、請求項 1 に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法。

【請求項 3】 脱離の反応温度が-10～50℃である、請求項 1 又は 2 に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法。

【請求項 4】 脱離の反応を液相反応又は気相反応で行う、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法を用いたペプチドの解析方法。

【請求項 6】 質量分析を用いる、請求項 5 に記載のペプチドの解析方法。

【請求項 7】 マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) 及び飛行時間型質量分析法 (TOFMS) を用いる、請求項 6 に記載のペプチドの解析方法。

【請求項 8】 フッ化水素酸を用いてペプチドのリン酸基を脱離することで見出されるペプチドを含む新規化合物。

【請求項 9】 請求項 8 で得られた新規化合物から開発される医薬品候補化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質化学及びペプチド・タンパク質の質量分析学に関する。

【0002】

【従来技術】

多くのタンパク質は、ゲノムから転写、翻訳された後、さらに修飾（翻訳後修飾）されることでその活性や機能が調節されている。翻訳後修飾反応としては、

リン酸化、硫酸化、アセチル化、糖付加、脂質修飾などが挙げられるが、特にリン酸化反応は、細胞内情報伝達、細胞内代謝活性、細胞周期などを制御する重要な役割を担っている。したがって、このような翻訳後修飾形態を有するタンパク質を解析することは、タンパク質の機能を理解する上で大変重要である。

【0003】

例えば、リン酸化修飾を受けたタンパク質の解析を行う場合、脱リン酸化がしばしば行われる。従来、この脱リン酸化は、アルカリ性フォスファターゼ等の酵素を用いて行われてきた。しかし、解析するタンパク質によっては、酵素の基質特異性や構造依存性等が原因して脱リン酸化が不完全に起こるという問題がある。

【0004】

一方、リン酸化された糖鎖を、フッ化水素酸を用いて脱リン酸化する方法が知られている（例えば、非特許文献1～3参照。）。

【0005】

【非特許文献1】

イー・ファックス (E. Fuchs)、シー・ジルバーク (C. Gilvarg) 著、「アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)」、(米国)、第90巻、1978年、p. 465-473

【非特許文献2】

シー・ジェイ・リー (C. J. Lee)、ビー・エー・フレイサー (B. A. Fraser) 著、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、第255巻、1980年、p. 6847-6853

【非特許文献3】

エル・アール・フィリップス (L. R. Phillips)、オー・ニシムラ (O. Nishimura)、ビー・エー・フレイサー (B. A. Fraser) 著、「カルボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Research)」、(米国)、第121巻、1983年、p. 243-255

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明の目的は、酵素を用いずに化学的処理によってペプチドのリン酸基を脱離する方法及びその方法を用いてペプチドの解析を効率良く行う方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討した結果、ペプチドとフッ化水素酸を反応させることによって上記目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、フッ化水素酸を用いてペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

なお、本明細書においてペプチドとは、タンパク質を含む意味で用いる。

【0009】

本発明は、前記フッ化水素酸を、10～100重量%の水溶液で用いる、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

本発明は、脱離の反応温度が-10～50℃である、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

本発明は、脱離の反応を液相反応又は気相反応で行う、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

【0010】

本発明は、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法を用いたペプチドの解析方法である。

本発明は、質量分析を用いる、前記のペプチドの解析方法である。

質量分析には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)及び飛行時間型質量分析法(TOFMS)を用いることが好ましい。

【0011】

本発明は、フッ化水素酸を用いてペプチドのリン酸基を脱離することで見出されるペプチドを含む新規化合物である。

本発明は、前記得られた新規化合物から開発される医薬品候補化合物である。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明においては、フッ化水素酸を用いて試料のペプチドが有するリン酸基を脱離する。

リン酸化の形態としては、モノエステル化に限らない。つまり、リン酸モノエステル化、リン酸ジエステル化の形態が挙げられ、理論上、リン酸トリエステル化の形態も挙げられる。

【0013】

本発明はフッ化水素酸を用いた化学的手法であるため、基質特異性や構造依存性を有する酵素を用いた手法とは異なりペプチドの種類に関係なくリン酸化が完全に進行する。従って、どのような種類のペプチドであっても適応できるという利点がある。

【0014】

本発明の方法においては、ペプチドにフッ化水素酸を加えて反応させる。反応は、液相反応でも気相反応でも良い。

【0015】

用いるフッ化水素酸の量は特に限定されないが、例えば、ペプチドの量に対して10～100000重量%用いることができる。

【0016】

液相反応の場合、フッ化水素酸は10～100重量%、好ましくは10～60重量%の水溶液で用いることができる。上記範囲の濃度により、脱リン酸化反応が十分に進行する。10重量%より少ないと、脱リン酸化が完結しないことがある。

【0017】

本発明における反応温度は、-10～50℃が好ましく、0～25℃がより好ましい。上記範囲の温度により、脱リン酸化反応が十分に進行する。-10℃より低い温度では、脱リン酸化反応の進行が極めて遅くなる。50℃より高い温度では、副生成物が増加する傾向にある。

【0018】

本発明における反応時間は特に限定されないが、例えば10分～5時間で反応を行うことができる。

【0019】

上述のようにして、ホスホペプチドのリン酸基が脱離されたペプチドを得る。なお、この方法ではペプチド結合はインタクトに保たれる。

本発明のペプチドのリン酸基を脱離する方法を用いると、ペプチドの解析を効率よく行うことができる。

例えば、上述のようにしてリン酸基の脱離を行ったペプチドを、そのままか、又は必要に応じて断片化した後、種々の分析法によって解析することができる。あるいは、ホスホペプチドを必要に応じ断片化した後にリン酸基の脱離を行い、その後、種々の分析法によって解析しても良い。分析法としては、質量分析法を用いることが好ましい。ペプチドの解析方法の一例として、ペプチドを断片化した後に質量分析を行う場合は、例えば次のようにして解析することができる。

【0020】

まず、ホスホペプチドを酵素消化などにより断片化し、得られたホスホペプチド断片混合物のマススペクトルを測定する。次いで、脱リン酸化反応を行い、得られたペプチド断片混合物のマススペクトルを測定する。双方のマススペクトルを比較し、変化したスペクトルピークから、修飾を受けていたペプチド断片を判定することができる。また、変化した質量の差から、そのリン酸基を判定することができる。例えば、リン酸モノエステル化されたアミノ酸残基を持つペプチドを本発明に従って処理した場合、リン酸基1個あたり分子量が80減少したピークが検出される。

次に、修飾されているペプチド断片のタンデムマスを測定することによって、修飾を受けているアミノ酸残基及びその部位を決定することができる。

【0021】

また、質量分析には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)及び飛行時間型質量分析法(TOFMS)を用いることが好ましい。

【0022】

上記した本発明の方法を用いると、従来の酵素方法では脱リン酸化が不完全な

ために解析が困難であったペプチドの同定、及びその機能を明らかにすることが容易になる。すなわち、本発明の方法は、リン酸化タンパク質のプロテオーム解析により広く応用することができる。本発明によって明らかにされたタンパク質が特定の疾患に関与するものである場合、該タンパク質を標的として特異的に作用し、その機能を効果的に制御する化合物をコンピュータで理論的にデザインすることによって、医薬品候補化合物を創出することができる。また、該タンパク質をコードする遺伝子の情報を見出し、該遺伝子の発現を特異的に制御する物質を医薬品候補化合物として創出することができる。本発明の方法は、これら医薬品候補化合物の創出をより効率的なものにすることができる。

【0023】

【実施例】

以下に実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。以下において、「%」は特に断りのない限り、すべて重量基準である。

【0024】

本実施例では、ペプチドの翻訳後修飾の中でも最も重要なリン酸化に着目した。リン酸化を受け得るアミノ酸残基は、主としてセリン、スレオニン及びチロシンの3種であるため、次の3種のホスホペプチドについてフッ化水素酸による脱リン酸化を行った。

1. WAGGDAPSGE (配列表の配列番号1) (セリン残基がリン酸化されたペプチド)
2. TRDIPYETDYRK (配列表の配列番号3) (チロシン残基がリン酸化されたペプチド)
3. GFEP TVPETG-NH₂ (配列表の配列番号5) (スレオニン残基がリン酸化されたペプチド)

【0025】

【実施例1】

アミノ酸配列がWAGGDAPSGE (配列表の配列番号1) であるホスホペプチド (アメリカン・ペプチド・カンパニー社製、カイウサギ (*Oryctolagus cu*

niculus) のデルタ睡眠誘発ペプチド (Delta Sleep Inducing Peptide; D S I P) を用いた。このホスホペプチドはセリン残基がリン酸化されており、リン酸化セリン残基を p S で表している。

【0026】

凍結乾燥させた配列番号 1 のホスホペプチド $100 \mu\text{g}$ に 50% フッ化水素酸 $50 \mu\text{l}$ を氷冷下に加え、 0°C で 3 時間反応させた。ドラフト中で反応溶液に N_2 気流を吹き付けて蒸発・乾固した。得られた残渣を水 $100 \mu\text{l}$ で溶解し、MALDI-TOFMS ((株) 島津製作所製、AXIMA-CFR) を用いて測定した。

【0027】

図 1 は、上記反応条件 (50% HF、 0°C 、3 時間 (3hr)) によって脱リン酸化が起こり、アミノ酸配列が WAGGDASGE (配列表の配列番号 2) のペプチドが得られたことを確認するために、得られたマスペクトルチャートと他のスペクトルチャートとを比較したものである。上段は上記反応による生成物のスペクトルチャート (シグナル強度: 240 mV)、中段は、別途調製された配列番号 2 と同じ配列を有するペプチドのスペクトルチャート (シグナル強度: 1498 mV)、下段はホスホペプチド WAGGDAPSGE (配列表の配列番号 1) のスペクトルチャート (シグナル強度: 469 mV) である。図 1 中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量/電荷 ($\text{; Mass/Charge (m/z)}$)、縦軸にイオンの相対強度 (Int.) を表す。

【0028】

上段のスペクトルチャートにおいては、 $(\text{m/z}) = 849.39 (\text{M}^+)$ の分子イオンピークが検出された。この分子イオンピークは、下段で検出された $(\text{m/z}) = 929.34 (\text{M}^+)$ の分子イオンピークより分子量が 80 小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。さらに、上段のスペクトルチャートは、中段のスペクトルチャートと良い一致を示した。これらのことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

【0029】

[実施例 2]

アミノ酸配列がTRDIpYETDYYRK (配列表の配列番号3) であるホスホペプチド (シグマ社製、ヒト (Homo sapiens) のインスリンレセプター1142-1153 (Insulin receptor 1142-1153)) を用いた。このホスホペプチドはN末端から5番目のチロシン残基がリン酸化されており、リン酸化チロシン残基をpYで表している。

【0030】

凍結乾燥させた配列番号2のホスホペプチド100 μ gに50%フッ化水素酸50 μ lを氷冷下に加え、0℃で3時間反応させた。ドラフト中で反応溶液にN₂気流を吹き付けて蒸発・乾固した。得られた残渣を水100 μ lで溶解し、MALDI-TOFMS ((株) 島津製作所製、AXIMA-CFR) を用いて測定した。

【0031】

図2は、上記反応条件 (50%HF、0℃、3時間(3hr)) によって脱リン酸化が起こり、アミノ酸配列がTRDIYETDYYRK (配列表の配列番号4) のペプチドが得られたことを確認するために、得られたマスペクトルチャートと他のスペクトルチャートとを比較したものである。上段は上記反応による生成物のスペクトルチャート (シグナル強度: 253 mV)、中段は、別途調製された配列番号4と同じ配列を有するペプチドのスペクトルチャート (シグナル強度: 123 mV)、下段はホスホペプチドTRDIpYETDYYRK (配列表の配列番号3) のスペクトルチャート (シグナル強度: 123 mV) である。図2中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量/電荷 (; Mass/Charge (m/z))、縦軸にイオンの相対強度 (Int.) を表す。

【0032】

上段のスペクトルチャートにおいては、(m/z)=1622.76 (M⁺) の分子イオンピークが検出された。この分子イオンピークは、下段で検出された(m/z)=1072.79 (M⁺) の分子イオンピークより分子量が80小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。さらに、上段のスペクトルチャートは、中段

のスペクトルチャートと良い一致を示した。これらのことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

【0033】

〔実施例3〕

アミノ酸配列がGFEPETVG-NH₂（配列表の配列番号5）であるホスホペプチドを合成した。このホスホペプチドはN末端から4番目のスレオニン残基がリン酸化されており、リン酸化スレオニン残基をpTで表している。さらにこのホスホペプチドは、C末端のグリシンがアミド化されており、アミド化されたグリシン残基をG-NH₂で表している。

【0034】

凍結乾燥させた配列番号3のホスホペプチド100 μ gに50%フッ化水素酸50 μ lを室温下に加え、室温で3時間反応させた。ドラフト中で反応溶液にN₂気流を吹き付けて蒸発・乾固した。得られた残渣を水100 μ lで溶解し、MALDI-TOFMS（（株）島津製作所製、AXIMA-CFR）を用いて測定した。

【0035】

図3は、上記反応条件（50%HF、室温(RT)、3時間(3hr)）によって脱リン酸化が起こり、アミノ酸配列がGFETVPETG-NH₂（配列表の配列番号6）のペプチドが得られたことを確認するために、得られたマスマスペクトルチャートと他のスペクトルチャートとを比較したものである。上段は上記反応による生成物のスペクトルチャート（シグナル強度：40 mV）、中段は、別途合成した配列番号6と同じ配列を有するペプチドのスペクトルチャート（シグナル強度：325 mV）、下段はホスホペプチドGFEPETVG-NH₂（配列表の配列番号5）のスペクトルチャート（シグナル強度：177 mV）である。図3中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量／電荷（；Mass/Charge (m/z)）、縦軸にイオンの相対強度(Int.)を表す。

【0036】

上段のスペクトルチャートにおいては、(m/z)=973.86 (M⁺+K), 957.90 (M⁺+Na), 935.52 (M⁺+H) の分子イオンピークが検出

された。これら分子イオンピークは、下段で検出された $(m/z) = 1053.64$ ($M^+ + K$) , 1037.65 ($M^+ + Na$) , 1015.66 ($M^+ + H$) の分子イオンピークより分子量がそれぞれ 80 小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。さらに、上段のスペクトルチャートは、中段のスペクトルチャートと良い一致を示した。これらのことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

【0037】

以上の 3 種のホスホペプチドを用いた実施例全てにおいて、副反応を起こすことなく脱リン酸化が行われた。このように本発明の方法は、反応の特異性や構造依存性がなく、どのようなペプチドに対しても適用することができる。

【0038】

【実施例 4】

以上に実施例で述べた 3 種のモデルペプチドに加え、 α -カゼイン (bovine milk) を用いた脱リン酸化の検討を行った。 α -カゼインを定法によりトリプシン消化して消化断片の混合物を得、次いで IMAC 法 (G a カラム) によりホスホペプチドを濃縮した。このサンプルをフッ化水素酸 (50%) で処理し (0℃、3 時間)、脱リン酸化を行った。その結果、MALDI-TOFMS スペクトル上の (m/z) が 2000 までの範囲において $(m/z) = 1661.2$, 1952.3 の 2 本のホスホペプチド由来のピークが、フッ化水素酸処理後それぞれ $(m/z) = 1580.9$, 1872.0 へと変化した。処理前と処理後の質量数の差は 80 であるので、各々のフラグメントは 1 ヶ所リン酸化されていたことが分かった。

【0039】

【発明の効果】

本発明によれば、酵素を用いずに化学的処理によってペプチドのリン酸基を脱離する方法及びその方法を用いてペプチドの解析を効率良く行う方法が提供される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shimadzu corp.

<120> method for eliminating phosphorylated group of peptide and method
for analyzing peptide

<130> K1020713

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<223> Description of Sequence: Delta Sleep Inducing Peptide

<400> 1

Trp Ala Gly Gly Asp Ala Ser Gly Glu

15

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: dephosphorylated Delta Sleep I
nducing Peptide

<400> 2

Trp Ala Gly Gly Asp Ala Ser Gly Glu

1

5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<223> Description of Sequence: Insulin receptor 1142-1153

<400> 3

Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: dephosphorylated Insulin receptor 1142-1153

<400> 4

Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)

<223> AMIDATION

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic phosphopeptide

<400> 5

Gly Phe Glu Thr Val Pro Glu Thr Gly

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)

<223> AMIDATION

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: dephosphorylated synthetic phosphopeptide

<400> 6

Gly Phe Glu Thr Val Pro Glu Thr Gly

1

5

【0040】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1はカイウサギのDSIPである。配列番号2はカイウサギのDSIPを脱リン酸化したペプチドである。配列番号3はヒトのインスリンレセプターである。配列番号4はヒトのインスリンレセプターを脱リン酸化したペプチドである。配列番号5は合成ホスホペプチドである。配列番号6は合成ホスホペプチドを脱リン酸化したペプチドである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 配列表の配列番号1に記載のホスホペプチド、そのホスホペプチドを脱リン酸化して得られた配列表の配列番号2に記載のペプチド、及び別途調製された配列番号2と同じ配列を有するペプチドの、MALDI-TOSMSスペクトルチャートの比較図である。

【図2】 配列表の配列番号3に記載のホスホペプチド、そのホスホペプチドを脱リン酸化して得られた配列表の配列番号4に記載のペプチド、及び別途調製された配列番号4と同じ配列を有するペプチドの、MALDI-TOSMSスペクトルチャートの比較図である。

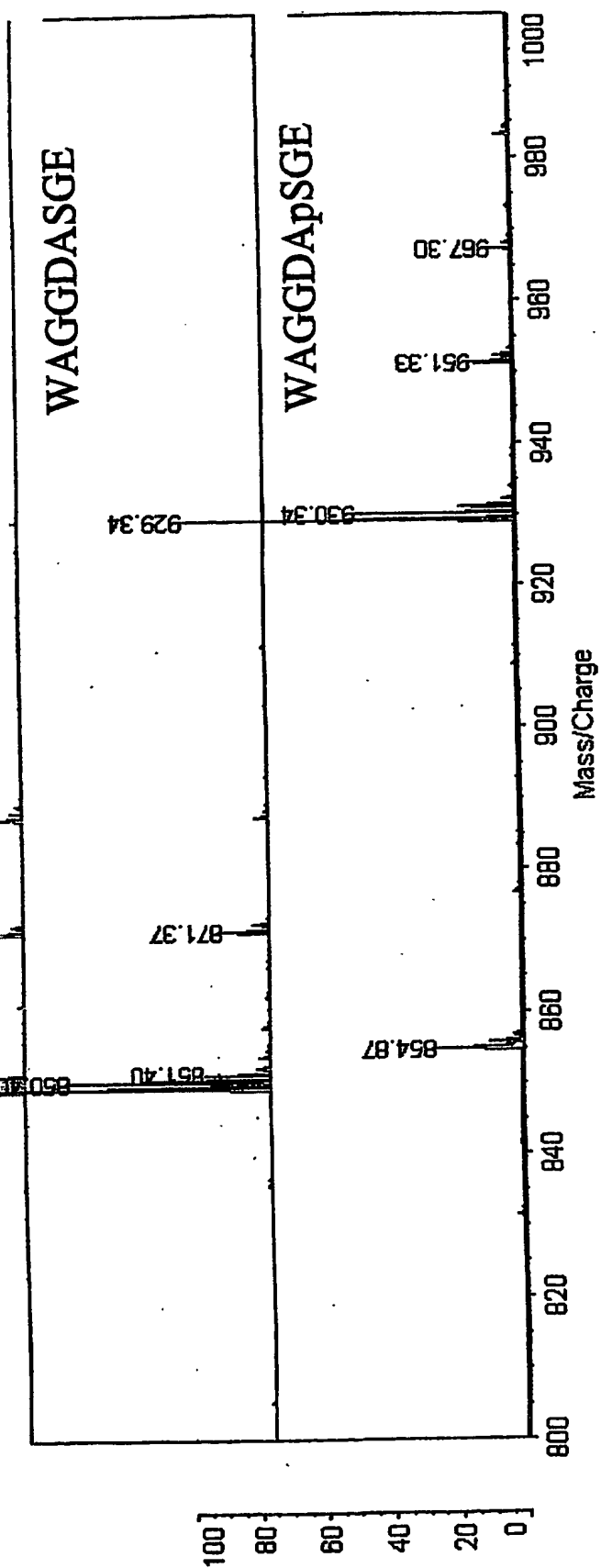
【図3】 配列表の配列番号5に記載のホスホペプチド、そのホスホペプチドを脱リン酸化して得られた配列表の配列番号6に記載のペプチド、及び別途合成した配列番号6と同じ配列を有するペプチドの、MALDI-TOSMSスペクトルチャートの比較図である。

【書類名】

図面

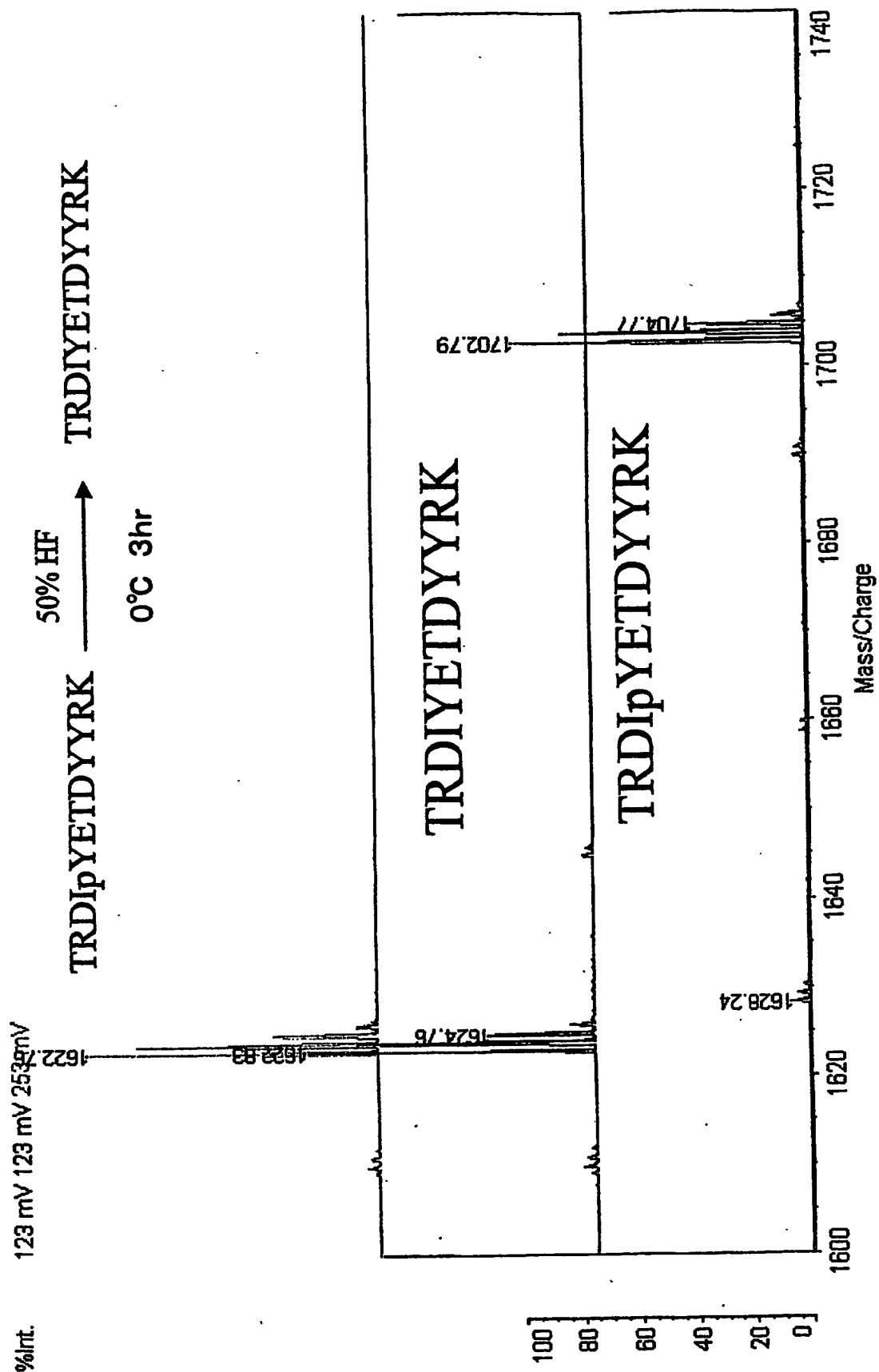
【図 1】

469 mV 1498 mV 240 mV
 WAGGDapSGE $\xrightarrow{50\% \text{ HF}}$ WAGGDASGE
 0°C 3hr

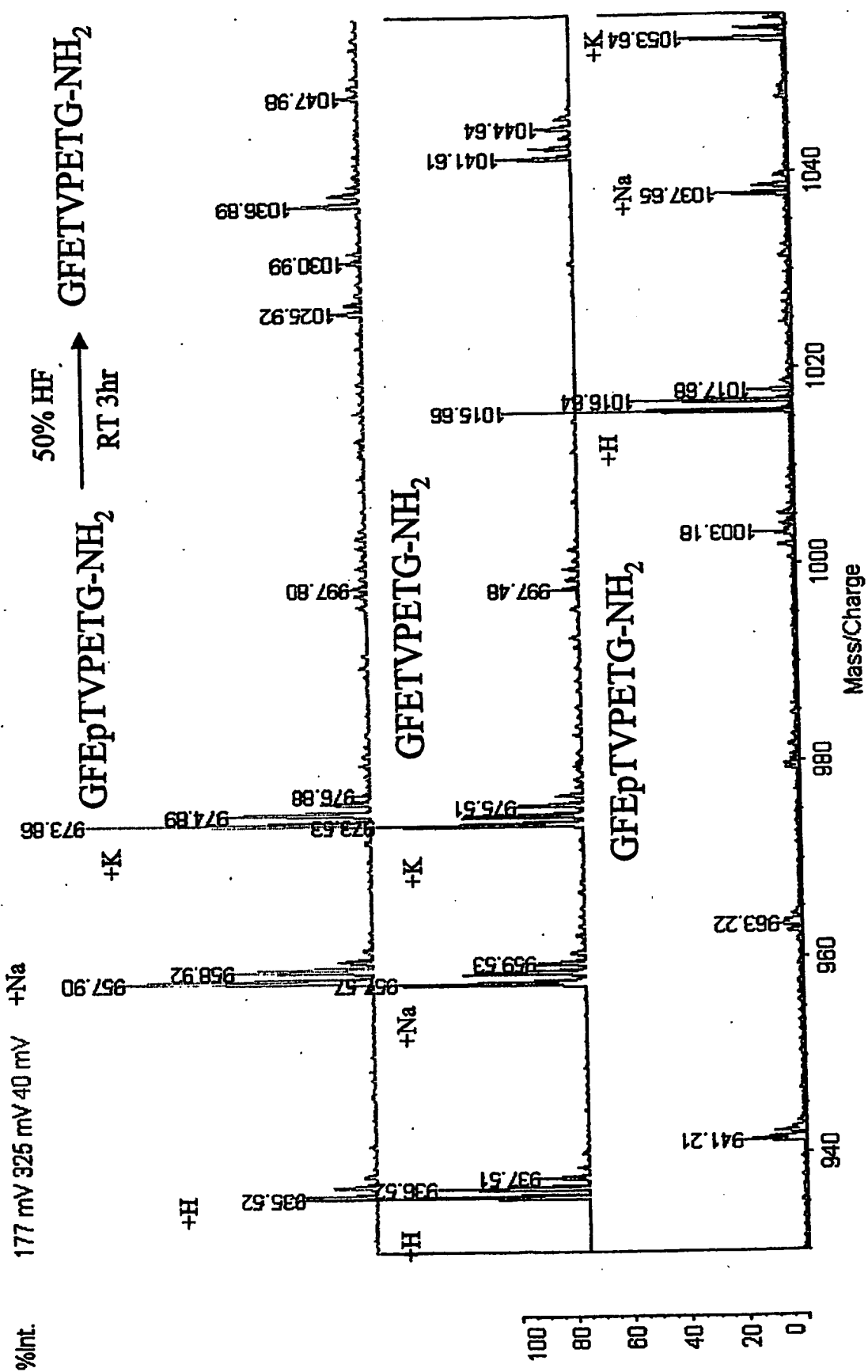


特 2 0 0 3 - 0 3 6 4 7 2

【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酵素を用いずに化学的処理によってペプチドのリン酸基を脱離する方法及びその方法を用いてペプチドの解析を効率良く行う方法を提供する。

【解決手段】 フッ化水素酸を用いてペプチドのリン酸基を脱離する方法及びその方法を用いたペプチドの解析方法。ペプチドのリン酸基の脱離は、好ましくはフッ化水素酸を10～100重量%の水溶液で用い、-10～50℃の反応温度で行う。またペプチドの解析は、好ましくはMALDI-TOFMSを用いた質量分析によって行う。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001993]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
氏 名	株式会社島津製作所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.